

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12N 15/57, 9/64, G01N 33/50, C12N 1/21, 1/19, 5/10	A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 95/25171 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 21. September 1995 (21.09.95)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE95/00357 (22) Internationales Anmeldedatum: 17. März 1995 (17.03.95) (30) Prioritätsdaten: P 44 09 663.1 17. März 1994 (17.03.94) DE P 44 38 838.1 21. Oktober 1994 (21.10.94) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): MAX-DELBRÜCK-CENTRUM FÜR MOLEKULARE MEDIZIN [DE/DE]; Medizin, Robert-Rössle-Strasse 10, D-13125 Berlin (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): WILL, Horst [DE/DE]; Georg-Benjamin-Strasse 49, D-13125 Berlin (DE). HINZ-MANN, Bernd [DE/DE]; Rolandstrasse 65, D-13156 Berlin (DE). (74) Anwalt: BAUMBACH, Fritz; BioTeZ Berlin-Buch GmbH, Patentstelle, Robert-Rössle-Strasse 10, D-13125 Berlin (DE).	(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>	
(54) Title: DNA SEQUENCES FOR MATRIX METALLOPROTEASES, THEIR PRODUCTION AND USE (54) Bezeichnung: DNA-SEQUENZEN FÜR MATRIX-METALLPROTEASEN, IHRE HERSTELLUNG UND VERWENDUNG (57) Abstract <p>DNA sequences for human matrix metalloproteases are disclosed, as well as homologous DNA sequences homologous and derived therefrom. Also disclosed are the proteins and protein variants coded by these DNA sequences, their expression, preparation and use. The invention has applications in the fields of biomolecular, medical and pharmaceutical research, for medical diagnosis and therapy, and in the pharmaceutical and biotechnological industry.</p> (57) Zusammenfassung <p>Die Erfindung betrifft DNA-Sequenzen für menschliche Matrix-Metalloproteasen sowie davon abgeleitete und homologe DNA-Sequenzen. Sie betrifft ferner die durch diese DNA-Sequenzen kodierten Proteine und Proteinvarianten, ihre Expression, Gewinnung und Nutzung. Anwendungsgebiete sind die molekularbiologische, medizinische und pharmazeutische Forschung, die medizinische Diagnostik und Therapie, die pharmazeutische und die biotechnologische Industrie.</p>		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	GA	Gabon	MR	Mauretanien
AU	Australien	GB	Vereinigtes Königreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GE	Georgien	NE	Niger
BE	Belgien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BJ	Benin	IE	Irland	PL	Polen
BR	Brasilien	IT	Italien	PT	Portugal
BY	Belarus	JP	Japan	RO	Rumänien
CA	Kanada	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SI	Slowenien
CI	Côte d'Ivoire	KZ	Kasachstan	SK	Slowakei
CM	Kamerun	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CN	China	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
ES	Spanien	MG	Madagaskar	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	ML	Mali	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MN	Mongolei	VN	Vietnam

DNA-Sequenzen für Matrix-Metallproteasen, ihre Herstellung und Verwendung

Beschreibung

Die Erfindung betrifft DNA-Sequenzen für menschliche Matrix-Metalloproteasen sowie davon abgeleitete und homologe Sequenzen. Sie betrifft ferner die durch die DNA-Sequenzen kodierten Proteine und Proteinvarianten, ihre Expression, Gewinnung und Nutzung. Anwendungsgebiete sind die molekularbiologische, medizinische und pharmazeutische Forschung, die medizinische Diagnostik und Therapie, die pharmazeutische und die biotechnologische Industrie.

Matrix-Metalloproteasen hydrolysieren Proteine der extrazellulären Matrix. Sie verändern die Matrixstruktur und beeinflussen Zell-Matrix-Wechselwirkungen. Zu den Matrix-Metalloproteasen gehören Kollagenasen, Gelatinasen, Stromelysine und Metalloelastasen /1/. Die Enzyme sind u. a. an folgenden physiologischen Prozessen beteiligt: Ovulation /2/, Embryoimplantation in den Uterus /3/, Zellmigrationen und Gewebeumlagerungen während der Embryogenese /4/, Involution von Brustdrüse /5/ und Uterus /6/, Angiogenese /7/. Matrix-Metalloproteasen spielen eine wichtige Rolle in der Wundheilung und Narbenbildung /8/, bei der Metastasierung von Tumorzellen /9, 10/, bei rheumatischer Arthritis und bei Osteoarthritis /11, 12/, bei periodontalen Erkrankungen /13/.

Alle Matrix-Metalloproteasen enthalten im aktiven Zentrum ein Zn^{2+} - Ion. Die Aktivierung der in Form inaktiver Proenzyme synthetisierten Matrix-Metalloproteasen erfordert die Lösung einer Bindung zwischen dem Zn^{2+} - Ion im aktiven Zentrum und einem Cys-Rest im N-terminalen Propeptid von Matrix-Metalloproteasen (Cystein-Schalter) /14/. Matrix-Metalloproteasen bestehen aus mehreren Proteindomänen, die Homologie zueinander aufweisen /1, 14/. Während die Protease Matrilysin nur aus einem Propeptid und der Aminosäuresequenz der katalytischen Domäne besteht, enthalten andere Matrix-Metalloproteasen darüberhinaus eine hämopexin-ähnliche Sequenz von ca 200 Aminosäuren. Die Gelatinasen A und B enthalten zusätzliche Aminosäurefolgen. Bekannte Matrix-Metalloproteasen des Menschen, ihre Molekulargewichte und ihre bevorzugten Substrate sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Die verschiedenen Matrix-Metalloproteasen zeichnen sich nicht nur durch charakteristische makromolekulare Spezifität für Matrixproteine aus. Ihre Aktivität wird auf verschiedenen molekularen und zellulären Ebenen kontrolliert:

1. Regulation der Synthese von Matrix-Metalloproteasen durch Wachstumsfaktoren, Cytokine, Polypeptidhormone, Prostaglandine, Glukocorticoide, Estrogen, Progesteron und andere Effektoren /1, 14/.
2. Binding von Matrix-Metalloproteasen an Membranrezeptoren /15/.
3. Aktivierung inaktiver Proenzyme durch spezifische Hydrolyse der jeweiligen Propeptide /16/ oder durch Oxydation /17/.
4. Hemmung von Matrix-Metalloproteasen durch spezifische Proteininhibitoren wie TIMP-1, TIMP-2 und TIMP-3 (TIMP = Tissue Inhibitor of Matrix-Metalloproteases) /16/.
5. Proteolytischer Abbau von Matrix-Metalloproteasen.

Matrix-Metalloproteasen werden auf Grund ihrer wichtigen physiologischen Funktionen und ihrer Rolle in der Pathogenese von Krankheiten intensiv untersucht. Es besteht Interesse an der Auffindung und Charakterisierung weiterer Matrix-Metalloproteasen.

Die vorliegende Erfindung hat das Ziel, neuartige und bisher nicht bekannte Matrix-Metalloproteasen des Menschen für die medizinische Forschung, Diagnostik und Therapie zu erschließen. Die Aufgabe besteht darin, DNA-Sequenzen für Matrix-Metalloproteasen zu identifizieren und zu isolieren, sowie die durch die DNA-Sequenzen kodierten Proteine zu charakterisieren.

Die Erfindung wird gemäß den Ansprüchen 1 - 16 realisiert.

Neuartige Matrix-Metalloproteasen werden durch folgendes Verfahren ermittelt:

In Sequenzen bekannter Matrix-Metalloproteasen werden konservierte Aminosäurefolgen ausgewählt. Zwei geeignete Folgen sind Aminosäuren um einen konservierten Cys-Rest im

Propeptid (Cystein-Schalter) und Aminosäuren³, die an der Zn^{2+} -Bindung im aktiven Zentrum der Enzyme beteiligt sind. Für die ausgewählten Peptide werden degenerierte Oligonukleotide synthetisiert. Mit den Oligonukleotiden und cDNA, welche durch reverse Transkription von mRNA aus Zellen und Geweben erhältlich ist, werden Polymerase-Ketten-Reaktionen (PCR) durchgeführt. Synthetisierte DNA-Fragmente werden kloniert und sequenziert. Die ermittelten Sequenzen werden mit Sequenzen in Gendatenbanken verglichen. PCR-Produkte mit neuartigen, bisher nicht bekannten Nukleotidfolgen und Homologie zu DNA-Sequenzen von Matrix-Metalloproteasen werden als Sonden zur Bestimmung der Genexpression und zur Gewinnung vollständiger cDNA-Sequenzen aus cDNA-Banken genutzt. Die Nukleotidfolgen vollständiger cDNA werden ermittelt. Die Aminosäuresequenzen der zugehörigen Proteine werden durch Translation der kodierenden Nukleotidregionen abgeleitet und nach bekannten Verfahren analysiert.

Folgende cDNA-Sequenzen wurden ermittelt:

1. cDNA-Sequenz mmpm1a bestehend aus

- 5'-nichttranslatierter Region: Basenpaare 1 bis 141
 - kodierender Region: Basenpaare 142 bis 1881
 - 3'-nichttranslatierter Region: Basenpaare 1882 bis 3456
- (siehe Anlage 1)

2. cDNA-Sequenz mmpm1b bestehend aus

- 5'-nichttranslatierter Region: Basenpaare 1 bis 113
 - kodierender Region: Basenpaare 114 bis 1862
 - 3'-nichttranslatierter Region: Basenpaare 1863 bis 3437
- (siehe Anlage 2)

3. cDNA-Sequenz mmpm2 bestehend aus

- 5'-nichttranslatierter Region: Basenpaare 1 bis 48
 - kodierender Region: Basenpaare 49 bis 2058
 - 3'-nichttranslatierende Region: Basenpaare 2059 bis 3530
- (siehe Anlage 3)

Die Erfindung umfaßt auch Varianten dieser Sequenzen sowie homologe DNA-Sequenzen des Menschen und anderer Säugerspezies, die durch Kreuzhybridisierung mit diesen Sequenzen aufgefunden werden. Zur Erfindung gehören ebenfalls Konstrukte, die aus einem Vektor für den Gentransfer in prokaryotische oder eukaryotische Zellen und einer der erfindungsgemäßen Sequenzen bestehen.

Mit Hilfe der Sequenzen mmpm1a, mmpm1b und mmpm2 können verschiedene Aspekte der Biosynthese kodierter Matrix-Metalloproteasen untersucht werden. Es können die Strukturgene einschließlich flankierender Sequenzen ermittelt werden. cDNA-Sequenzen können als molekulare Sonden zur Analyse der Genexpression in Zellen und Geweben verwendet werden.

Die cDNA-Sequenzen mmpm1a, mmpm1b und mmpm2 kodieren folgende Aminosäuresequenzen:

MMPm1a

```
1  MTYEMEHLFR CLFAACVSSL VFGSFFNHVV SFSFLFFESL ALSSGVECNG
51  AISAYCNLCL LGSSDSPASA SQIAGKADAD TMKAMRRPRC GVPDKFGAEI
101 KANVRRKRYA IQGLKWQHNE ITFCIQNYTP KVGEYATYEA IRKAFRVWES
151 ATPLRFREVP YAYIREGHEK QADIMIFFAE GFHGDSTPFD GEGGFLAHAY
201 FPGPNIGGDT HFDSAEPWTV RNEDLNGNDI FLVAVHELGH ALGLEHSSDP
251 SAIMAPFYQW MDTENFVLPD DRRGIQQLY GGESGFPTKM PPQPRTTSRP
301 SVPDKPKNPT YGPNICDGNF DTVAMLRGEM FVFKERWFWR VRNNQVMDGY
351 PMPIGQFWRG LPASINTAYE RKGDKFVFFK GDKHWVFDEA SLEPGYPKHI
401 KELGRGLPTD KIDAALFWMP NGKTYFFRGN KYRFNEELR AVDSEYPKNI
451 KWEGIPESP RGSFMGSDEV FTYFYKGNKY WKFNQKLKV EPGYPKSALR
501 DWMGCPSSGR PDEGTEETE VIIIEVDEEG GGAVSAAAVV LPVLLLLLVL
551 AVGLAVFFFR RHGTPRRLLY CQRSLLDKV*
```

5

MMPm1b

1 MSPAPRPPRC LLLPLLTGTLT ALASLGSAQS SSFSPEAWLQ QYGYLPPGDL
51 RTHTRSPQS LSAAIAAMQK FYGLQVTGKA DADTMKAMRR PRCGVDPKFG
101 AEIKANVRRK RYAIQGLKWQ HNEITFCIQN YTPKVGEYAT YEAIRKAFRV
151 WESATPLRFR EVPYAYIREG HEKQADIMIF FAEGFHGDST PFDGEGGFLA
201 HAYFPGPNIG GDTHFDSAEP WTVRNEDLNG NDIFLVAVHE LGHALGLEHS
251 SDPSAIMAPF YQWMDTENFV LPDDDRRGIO QLYGGESGFP TKMPPQPRTT
301 SRPSVPDKPK NPTYGPNICD GNFDTVAMLR GEMFVFKERW FWRVRNNQVM
351 DGYMPPIGQF WRGLPASINT AYERKDGKRV FFKGDKHWVF DEASLEPGYP
401 KHIKELGRGL PTDKIDAALF WMPNGKTYFF RGNKYRFNE ELRAVDSEYP
451 KNIKVWEGIP ESPRGSMGS DEVFTYFYKG NKYWKFNQK LKVEPGYPKS
501 ALRDWMCPS GGRPDEGTEE ETEVIIIEVD EEGGGAVSAA AVVLPVLLLL
551 LVLAVGLAVF FFRRHGTPRR LLYCQRSLLD KV*

MMPm2

1 MGSDPSAPGR PGWTGSLLGD REEAARPLL PLLLVLLGCL GLGVAEDAE
51 VHAENWLRLY GYLPQPSRHM STMRSQILA SALAEMQRFY GIPVTGVLDE
101 ETKEWMKRPR CGVPDQFGVR VKANLRRRRK RYALTGRKWN NHHLTFSIQN
151 YTEKLGWYHS MEAVRRAFRV WEQATPLVFQ EVPYEDIRLR RQKEADIMVL
201 FASGFHGDSS PFDGTGGFLA HAYFPGPGLG GDTHFDAEP WTFSSDHLHG
251 NNLFLVAVHE LGHALGLEHS SNPNAIMAPF YQWKDVDFNK LPEDDLRGIO
301 QLYGTPDGQP QPTQPLPTVT PRRPGRPDHR PRRPPQPPPP GGKPERPPKP
351 GPPVQPRATE RPDQYGNIC DGDFDTVAML RGEMFVFKGR WFWRVRHNRV
401 LDNYPMPIGH FWRGLPGDIS AAYERQDGRF VFFKGDRYWL FREANLEPGY
451 PQPLTSYGLG IPYDRIDTAI WWEPTGHTFF FQEDRYWRFN EETQRGDPGY
501 PKPISVWQGI PASPKGAFLS NDAAYTYFYK GTKYWKFDNE RLRMEPGYPK

551 SILRDFMGCQ EHVEPGPRWP DVARPPFNPH GGAEPGADSA EGDVGDGDGD
601 FGAGVNKDGG SRVVVQMEEV ARTVNVVMVL VPLLLLLCVL GLTYALVQMQ
651 RKGAPRVLLY CKRSLQEWV*

Die Erfindung umfaßt auch Varianten dieser Proteine, die durch posttranslationale Proteinmodifizierung, durch proteinchemische Modifikationen oder durch in vitro Mutagenese und Expression von Nukleotidfolgen erhalten werden sowie homologe Proteine des Menschen und anderer Säugerspezies, die durch immunologische Kreuzreaktivität oder vergleichbare Enzymaktivität identifiziert werden. Zur Erfindung gehören ebenfalls Komplexe dieser Proteine mit einem oder mehreren Liganden.

MMPm1a, MMPm1b und MMPm2 können aus natürlichen Quellen isoliert werden. Die Proteine können auch durch Gentransfer und Expression in prokaryotischen und eukaryotischen Zellen synthetisiert und aus den rekombinanten Zellen gewonnen werden. Die Verfügbarkeit der Proteine MMPm1a, MMPm1b und MMPm2 ermöglicht Untersuchungen ihrer Struktur und Funktion. Es können Methoden der Bestimmung der enzymatischen Aktivität und Spezifität ausgearbeitet werden. Ausgehend von der Primärstruktur der Proteine MMPm1a, MMPm1b und MMPm2 können monoklonale und polyklonale Antikörper hergestellt werden. Die Antikörper können zur diagnostischen Analytik von MMPm1a, MMPm1b und MMPm2 eingesetzt werden. MMPm1a, MMPm1b und MMPm2 können als Teststrukturen für die Auffindung natürlicher und synthetischer Aktivatoren und Inhibitoren von Matrix-Metalloproteasen verwendet werden.

Zur Charakterisierung von mmpm1a, mmpm1b und mmpm2 sowie MMPm1a, MMPm1b und MMPm2 werden folgende weitere Angaben gemacht:

Die DNA-Sequenzen mmpm1a und mmpm1b unterscheiden sich nur in ihren 5'-nichttranslatierten Regionen und in den unmittelbar darauffolgenden Teilen ihrer kodierenden Regionen. Beginnend mit den Nukleotiden 363 (mmpm1a) bzw 344 (mmpm1b) sind beide Sequenzen identisch. In der Sequenz mmpm1a ist ein offener Leserahmen von 580 Codons enthalten. Der Leserahmen beginnt mit den Nukleotiden A₁₄₂TG. Die Umgebung dieser Nukleotide ist für eine effektive Translation jedoch ungünstig. Dagegen befinden sich die im Leserahmen

darauffolgenden Nukleotide A₁₁₄TG in einer für einen Translationsstart favorisierten Umgebung. Es ist möglich, daß die Translation von mmpm1a erst bei dem zweiten ATG beginnt. Die Sequenz mmp1b weist beginnend mit A₁₁₄TG einen offenen Leserahmen von 583 Codons aus. Das Startcodon befindet sich innerhalb der Nukleotidfolge ACCATGT, die eine effektivere Translation begünstigt.

Der Translationsstart von mmpm2 befindet sich bei A₄₉TG. Der offene Leserahmen von mmpm2 enthält 670 Codons.

Die Proteine MMPm1a, MMPm1b und MMPm2, die sich aus den cDNA-Sequenzen mmpm1a, mmpm1b und mmpm2 ableiten, haben berechnete Molekulargewichte von 65 591, 65 900 und 75 813. Die Primärsequenzen von MMPm1a, MMPm1b und MMPm2 sind homolog zu Sequenzen bekannter Matrix-Metalloproteasen. Die drei neuartigen Enzyme enthalten je ein Signalpeptid, eine Prosequenz mit der Cystein-Schalter-Region PRCGVPD und eine Consensus-Sequenz RRKRYA. Es folgen Sequenzen katalytischer Domänen mit der spezifischen Anordnung von drei Histidinresten HELGHALGLEH und hämopexin-homologe Sequenzen. Im Unterschied zu bekannten Matrix-Metalloproteasen enthalten MMPm1a, MMPm1b und MMPm2 darüberhinaus C-terminale Sequenzen mit charakteristischen Folgen hydrophober Aminosäurereste. MMPm1a und MMPm1b weisen die hydrophobe Aminosäurefolge AA>VVLPVLLLLLVAVGLAV (Aminosäurepositionen 536-556 in MMPm1a, Aminosäurepositionen 539-559 in MMPm1b) auf. Eine analoge Sequenz in MMPm2 ist VVMVLVPLLLLLCVLGLTY (Aminosäurereste 626-645). Die hydrophoben Sequenzen, die noch über die angegebenen Positionen hinausgehen, werden von geladenen Aminosäureresten flankiert. N-terminal überwiegen negativ geladene Glutamin- und Aspartatreste, C-terminal positiv geladenen Arginin- und Lysinreste.

Die Anwesenheit der hydrophoben Sequenzen in MMPm1a, MMPm1b und MMPm2 erlaubt die Schlußfolgerung, daß MMPm1a, MMPm1b und MMPm2 - im Unterschied zu bekannten löslichen Matrix-Metalloproteasen (Tabelle 2) - membran-assoziierte Enzyme sind. Aus den Primärsequenzen folgt, daß Propeptide, katalytische Domänen und hämopexin-homologe Domänen der Proteasen extrazellulär lokalisiert sind. Die äußersten C-Termini der Proteine sollten sich dagegen im Zytosol MMPm1a-, MMPm1b- bzw MMPm2-exprimierender Zellen befinden.

MMPm2 enthält in Unterschied zu MMPm1a und MMPm1b einen potentiellen

Glykosylierungsort bei N₁₄₀YT.

MMPm1a und MMPm1b unterscheiden sich nur in ihren Signal und Prosequenzen. Die unterschiedliche Struktur der Prosequenzen impliziert unterschiedliche Aktivierungsmechanismen von MMPm1a und MMPm1b. Da die Prosequenzen im Laufe der Aktivierung von Matrix-Metalloproteasen durch Hydrolyse abgetrennt werden, sollte die Aktivierung von MMPm1a und MMPm1b zu einem identischen aktiven Enzym führen.

Northern-Blot-Analysen von mRNA menschlicher Gewebe belegen eine unterschiedliche Expression von MMPm1 und MMPm2. Matrix-Metalloproteasen vom Typ MMPm1 werden vor allem in Lungen-, Plazenta- Nieren-, Ovar-, Prostata-, Dünndarm-, Milz-, Thymus-, und Testisgewebe expremiert. Ihre Expression ist in Herz- und Pankreasgewebe deutlich geringer, in Hirn, Leber und Skelettmuskulatur kaum nachweisbar. MMPm2 wird in Plazenta, Herz, Leber, Skelettmuskel, Niere, Pankreas, Lunge, Testis, Colon und Dünndarm expremiert.

Zusammenfassend wird festgestellt, daß die Erfindung neuartige, bisher nicht bekannte Matrix-Metalloproteasen des Menschen zur Verfügung stellt. Die Kenntnis von cDNA und Proteinsequenzen der Matrix-Metalloproteasen gestattet die weitere Untersuchung von Biosynthese, Struktur und Funktion der Enzyme. Durch Analyse der Gensequenzen können vererbte und erworbene Mutationen aufgefunden werden. Die Bestimmung von Konzentration und Aktivität der Matrix-Metalloproteasen in Zellen, Geweben und Körperausscheidungen ermöglicht diagnostische Aussagen. Die Enzyme können vorteilhaft als Teststrukturen zur Auffindung neuer Pharmaka, darunter Aktivatoren und Inhibitoren von Matrix-Metalloproteasen verwendet werden.

Die Erfindung wird durch folgende Anwendungsbeispiele weiter erläutert:

1. Identifizierung neuartiger DNA-Sequenzen für Matrix-Metalloproteasen

Zur Auffindung von cDNA-Sequenzen, die für Matrix-Metalloproteasen kodieren, wurde mRNA aus menschlichen Zellen und Tumorgewebe, darunter Neuroblastomzellen, Nierenkarzinom- und Osteosarkomgewebe, isoliert. Die mRNA wurde mit reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben.

In den Proteinsequenzen bekannter Matrix-Metalloproteasen wurden zwei konservierte Aminosäurefolgen ausgewählt.

1. Eine Sequenz um einen charakteristischen Cys-Rest in Propeptiden von Matrix-Metalloproteasen (Cystein-Schalter):

P-R-C-G-V/N-P-D

2. Eine Sequenz mit drei His-Resten in der katalytischen Proteindomäne von Matrix-Metalloproteasen (Zn^{2+} - Bindungsregion):

H - E - L/M/F - G - H - S/V/A - L/M - G

Entsprechend den Aminosäurefolgen wurden degenerierte Oligonukleotid-Primer, die sowohl die Variation der Aminosäuren in den beiden konservierten Sequenzen, als auch die Degeneration des genetischen Codes berücksichtigen, synthetisiert:

1. Propeptid-Primer

5' - NN TCT AGA CCC AGI TGT GGI GTI CCI GA - 3'
C AA

2. Zn-Bindungsregion-Primer

5' - NN GGA TCC CC CAT IGA ATG ICC IAI TTC ATG - 3'
GCC G C G

Beide Primer enthalten je vier Deoxyinosinnukleotide sowie zusätzliche Nukleotide für Erkennungsorte der Restriktionsendonukleasen XbaI (Propeptid-Primer) und BamHI (Zn²⁺-Bindungsregion-Primer).

Die degenerierten Primer wurden zusammen mit cDNA in der PCR eingesetzt.

Das Reaktionsgemisch enthielt:

100 ng cDNA
1 µg Propeptid-Primer
1 µg Zn^{2+} -Bindungsregion-Primer
2,5 E/100µl DNA Polymerase AmpliTaq
100 µM dNTP
0,01 % Gelatine
50 mM KCl
1,5 mM $MgCl_2$
10 mM Tris-HCl, pH 8,3

Es wurden 30 Reaktionszyklen der Folge 50 sec 94°, 1 min 56°, 2 min 72° durchgeführt. Die amplifizierte DNA wurde mit Phenol/Chloroform extrahiert und anschließend mit den Restriktionsenzymen XbaI und BamHI gespalten. DNA-Fragmente der Größe 350-500 Basenpaare wurden durch Agarose-Gel-Elektrophorese isoliert (Abb. 1) und in dem Plasmid pBluescript SK (Stratagene) kloniert. Einzelne Klone wurden mit T3- und T7-Primern und Sequenase 2.0 (USB/Amersham Life Science) sequenziert. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit DNA-Sequenzen in den Datenbanken Genbank und EMBL verglichen. Der Sequenzvergleich erfolgte mit dem Programm FASTA des Programmpaketes HUSAR (GCG Package, Copyright Genetics Computer Group, Inc.). Ausgehend von Nierenkarzinom-cDNA wurden z. B. mehrere hundert Klone mit amplifizierter DNA erhalten, von denen 50 sequenziert wurden. Die Auswertung ergab sowohl bekannte als auch neuartige DNA-Sequenzen. Unter den ersteren waren Sequenzen für menschliche interstitielle Kollagenase und für Matrilysin. Unter den letzteren waren zwei Sequenzen mit Homologie zu menschlichen Matrix-Metalloproteasen. Die zwei neuartigen Sequenzen, die PCRmmpm1 und PCRmmpm2 bezeichnet wurden, enthielten folgende Nukleotide:

PCRmmpm1

TCTAGACCCAGGTGCGGGTGCCGGACAAGTTTGGGGCTGAGATCAAGGCCAATGTTCGAAGGAAGCGCT
ACGCCATCCAGGGTCTCAAATGGCAACATAATGAAATCACTTTCTGCATCCAGAATTACGCGCCCAAGGT

11

GGGCGAGTATGCCACATACGAGGCCATTGCGCAAGGCGTTCCGCATGTGGGAGAGTGCCACACCACTGCGC
TTGCGCGAGGTGCCCTATGCCTACATCCGTGAGGCCATGAGAAGCAGGCCGACATCATGATCTTCTTTGC
CGAGGGTTCCATGGCGACAGCGCCCTTCGATGGTGAGGGCGGCTTCCTGGCCCGTGCTACTTCCCAGGC
CCCAACATTGGAGGAGACACCACTTTGACTCTGCCGAGCCTTGGACTGTCAGGAATGAGGATCTGAATG
GAAATACATCTTCTGGTGGCTGTGCACGAACTEGGCCACCGCTGGGGGATCC

PCRmmpm2

TCTAGACCCAGGTGCGGGAAGCCGGACCAGTTCGGGGTACGAGTGAAAGCCAACCTGCGGCGGCGTCGGA
AGCGCTACGCCCTCACCGGGAGGAAGTGAATAACCAACCATCTGACCTTTAGCATCCAGAACTACACCG
GAGAAGTTGGGCTGGTACCCTCGATGGAGGCGGTGCGCAGGGCCTTCGCGTGTGGGAGCAGGCCACGC
CCCTGGTCTTCCAGGAGGTGCCCTATGAGACATCCGGCTGCGGCGACAGAAGGAGGCCGACATCATGGTA
CTCTTTCCCTCTGGCTTCCACGGCGAACAGCTCGCCGTTTGATGGCACCGGTGGCTTTCTGGCCCCACGCC
TATTTCCCTGGCCCCGGCCTAGGCGGGGACACCCATTTTGACGCAGATGAGCCCTGGACCTTCTCCAGCA
CTGACCTGCATGGAAACAACCTCTTCTGGTGGCAGTGCATGAGCTGGGCCACGCGCTGGGGGATCC

2. Northern-Blot-Analyse

Die Expression von Matrix-Metalloproteasen in menschlichen Geweben wurde mit Hilfe der Fragmente PCRmmpm1 und PCRmmpm2 untersucht. Die Fragmente wurden radioaktiv markiert (Multiprime DNA-Labeling Kit, Amersham Life Science) und mit mRNA auf Nylon (Multiple Tissue Blot, Clontech) hybridisiert. Die Hybridisierungen und anschließenden Waschungen erfolgten unter Standardbedingungen /18/.

Sowohl PCRmmpm1 als auch PCRmmpm2 hybridisieren mit RNA von ca 3,6 kb. Die Experimente belegten jedoch eine unterschiedliche Expression der mit PCRmmpm1 und PCRmmpm2 hybridisierenden mRNA (Abb. 2). Spezifische Transkripte, die mit PCRmmpm1 hybridisieren, sind insbesondere in Lungen-, Plazenta-, Nieren- und Nierenkarzinomgewebe (nicht dargestellt) enthalten. Sie sind in Pankreas- und Herzgewebe in deutlich geringer Menge, in Leber, Skelettmuskulatur und Hirn kaum vertreten.

Messenger RNA, die mit PCRmmpm2 hybridisiert, wird insbesondere in Plazentagewebe synthetisiert. Ihre Expression in Herz, Leber, Skelettmuskel, Niere, Pankreas und Lunge ist

jedoch vergleichbar. Sie ist in Hirngewebe deutlich geringer.

3. Isolierung und Sequenzierung von cDNA mmpm1 und mmpm2

Eine Lungen-cDNA-Bank im Vektor λ gt 11 (Clontech) wurde mittels Phagentransfer auf Nylon und Hybridisierung mit den radioaktiv markierten Sonden PCRmmpm1 und PCRmmpm2 analysiert /18/. Die Hybridisierungen wurden 16 h bei 40° in 50 % Formamid, 5 x SSPE, 5 x Denhardt, 0,5 % SDS, 50 µg/ml denaturierte Heringssperma-DNA durchgeführt. Nach der Hybridisierung wurden die Filter bei Raumtemperatur und bei 65° in 2 x SSC, 0,1 % SDS gewaschen und anschließend in einem Bio-Imaging-Analyzer (BAS 2000, Fuji Photo Film Co., LTD) ausgewertet. Phagenklone, die mit PCRmmpm1 und PCRmmpm2 hybridisierten, wurden anhand spezifisch gebundener Radioaktivität identifiziert. Die aufgefundenen Phagen wurden durch Ausverdünnen schrittweise vereinzelt. Die DNA vereinzelter Phagen wurde isoliert (Quiagen Lambda Kit, Diagen GmbH) und enthaltene cDNA-Inserte wurden in den Plasmidvektor pBluescript SK (Stratagene) eingefügt. Die Inserte wurden anschließend in Teilfragmente zerlegt (Erase-a-Base-System, Promega) und sequenziert (Sequenase 2.0, USB/Amersham Life Science). Ermittelte DNA-Sequenzen wurden mit Hilfe der Programmpakete DNA-STAR (DNA-STAR, Inc) und HUSAR (GCG Package, Copyright Genetics Computer Group, Inc) analysiert. Die Translation der kodierenden Sequenzen und der Vergleich der erhaltenen Aminosäuresequenzen mit bekannten Matrix-Metalloproteasen belegte, daß die neuartigen Sequenzen zu der Familie der Matrix-Metalloproteasen gehören (Abb. 3)

TABELLEN UND ABBILDUNGENTabelle 1:

Matrix-Metalloproteasen des Menschen. Die angegebenen Molekulargewichte sind aus den cDNA-Sequenzen der Enzyme berechnet.

Abb. 1:

Agarose-Gel-Elektrophorese von PCR-Produkten, die mit degenerierten Primern für Matrix-Metalloproteasen und cDNA der menschlichen Neuroblastomzelllinie SK-N-SH (Bahn 1), cDNA von Nierenkarzinomgewebe (Bahn 2) und cDNA von Osteosarkomgewebe (Bahn 3) erhalten wurden.

Abb. 2

Northern-Blot-Analyse von mRNA für MMPm1 (oben) und MMPm2 (unten)

Abb. 3

Homologievergleich von MMPm1a, MMPm1b und MMPm2 mit bekannten Matrix-Metalloproteasen des Menschen. Der Vergleich wurde mit dem Programm CLUSTAL durchgeführt. Die Abkürzungen bedeuten: hscollr.pep - Interstitielle Kollagenase, hscigna.pep - Neutrophile Kollagenase, P03253.swisspro - Gelatinase A, hs4cola.pep - Gelatinase B, hsmmp3a.pep - Stromelysin 1, hsstrom2.pep - Stromelysin 2, hsstrol3.pep - Stromelysin 3.

LITERATUR

1. Matrisian, L.M. (1992) Bioassays 14, 455-463
2. Curry, T.E.jr, Mann, J.S., Estes, R.J. und Jones, P.B.C. (1990) Endocrinology 127, 63-68
3. Librach, C.L., Werb, Z., Fitzgerald, M.L., Chiu, K., Corwin, N.M., Esteves, R.A., Grobelny, D., Galardy, R., Damsky, C.H. und Fisher, S.J. (1991) J. Cell Biol. 113, 437-449
4. Brenner, C.A., Adler, R.R., Rappolee, D.A., Pedersen, R.A. und Werb, Z. (1989) Genes Development 3, 848-859
5. Talhouk, R.S., Bissel, M.J. und Werb, Z. (1992) J. Cell Biol. 118, 1271-1282
6. Woessner, J.F. und Taplin, C. (1988) J. Biol. Chem. 263, 16918-16925
7. Folkman, J. und Shing, Y. (1992) J. Biol. Chem. 267, 10931-10934
8. Sakamoto, S. und Sakamoto, M. (1988) Mol. Aspects Med. 10, 301-428
9. Mignatti, P. und Rifkin, D.B. (1993) Physiol. Rev. 73, 161-195
10. Stetler-Stevenson, W.G., Liotta, L.A. und Kleiner, D.E.jr (1993), FASEB J. 7, 1434-1441
11. Dean, D.D., Martel-Pelletier, J., Pelletier, J.-P., Howell, D.S. und Woessner, J.F. jr, (1989) J. Clin. Invest. 84, 678-685
12. McCachren, S.S. (1991) Arthritis Rheum. 34, 1085-1093
13. Birkedahl-Hansen, H. (1993) J. Periodontol. 64, 474-484
14. Woessner, J.F.jr (1991) FASEB J. 5, 2145-2154
15. Monsky, W.L., Kelly, T., Lin, C.-Y., Yeh, Y., Stetler-Stevenson, W.G., Mueller, S.C. und Chen, W.-T. (1993) Cancer Res. 53, 3159- 3164
16. Kleiner, D.E.jr und Stetler-Stevenson, W.G. (1993) Curr. Opinion Cell Biol. 5, 891-897
17. Weiss, S.J., Peppin, G., Ortiz, X., Ragsdale, C. und Test, S.T. (1985) Science 227, 747-749
18. Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning. A Laboratory Manual. 2nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Tabelle 1**MATRIX-METALLOPROTEASEN**

Protease	M_r (kDa)	Substrate
Interstitielle Kollagenase (MMP-1)	54,1	Kollagene I, II, III
Neutrophile Kollagenase (MMP-5)	53,4	Kollagene I, II, III
Gelatinase A (MMP-2)	73,9	Kollagene IV, V, VII Gelatine, Elastin
Gelatinase B (MMP-9)	78,4	Kollagene IV, V Gelatine, Elastin
Stromelysin 1 (MMP-3)	54	Proteoglykane, Fibronectin, Laminin, Gelatine, Kollagene II, IV, V, IX
Stromelysin 2 (MMP-10)	54,1	Proteoglykane, Fibronectin, Laminin, Gelatine, Kollagene II, IV, V, IX
Matrilysin (MMP-7)	29,7	Proteoglykane, Fibronectin, Gelatine, Elastin
Stromelysin 3	54,6	
Metalloelastase	54	Fibronectin, Elastin

16

	10	20	30	40	50	60
MMPm1a.pep	MTYMEHLFR----	CLFA----	ACVSSLV--	FGSFFN-----	HVVSFS-----	
MMPm1b.pep	MS-PAPRPPR----	CLL-----	LPLLT--	LGTALASLG---	SAQSSSFS-PEAWLQQ	
MMPm2.pep	MGSDPSAPGRPGWTGSL	LDREEAARPLLPLLLV	LLGCLGLGVA	AEAEVH-AENWLRL		
hscollr.pep	M--HSFPPL-----	LLLLFWGVVS-----		HSFPATLETQE	QDV--DLVQKYLEK	
hscigna.pep	M--FSLKTL-----	PFLLLLHVQIS-----		KAFP--VSSKEKNT--	KTVQDYLEK	
p08253.swisspro	M--EALMARGALTGPLR-	ALCLLGCLLSHAAA	APSP	IKFP	GDVAPK-TDKELAVQYLNT	
hs4cola.pep	M-----SLWQPLVLV	LLVLGCCFAAPRQ	RQSTLVL	FP	GLRTNLTDRLAEYLYR	
hsmmp3a.pep	M-----KSL-----	PILLLLCVAVC-----		SAYPLDGAARGED	TSMNLVQKYLEN	
hsstrom2.pep	M-----MHL-----	AFLVLLCLPVC-----		SAYPLSGAAKEED	SNKDLAQYLEK	
hsstrol3.pep	MA-----PAWL-----	RSAAARALLPPML	LLLLLQPP	LLARA-----		
	*					
MMPm1a.pep	FLFFESLALSSGVE	CNGAISAYCNLCLL	GSSDSPASASQI	AGKADADTMKAMRR	PRCGVP	
MMPm1b.pep	YGYPGDLRTHTRSPQ	-----SLSAAIAAM	QKFYGLQVTG	KADADTMKAMRR	PRCGVP	
MMPm2.pep	YGYPQPSRHMSTMRSAQI	-----LASALAEM	QRFYGPVTG	VLDDEETKEWMKR	PRCGVP	
hscollr.pep	Y-YNLKNDGRQVEKRRNSGP	---VVEKLKQM	QEFFGLKVTG	KPDAETLKVMKQ	PRCGVP	
hscigna.pep	F-YQLPSNQYQSTRKNGTNV	---IVEKLKEM	QRFGLNVTG	KPNEETLDMKK	PRCGVP	
p08253.swisspro	F-YGCPKE-----SCNLFV	---LKDTLKKM	QKFGLPQTG	DLDDQNTIETMRK	PRCGNP	
hs4cola.pep	YGYTRVAEM-----RGESKS	---LGPALLLLQ	QSLPETGEL	DSATLKAMRT	PRCGVP	
hsmmp3a.pep	Y-YDLEKDVVKQFVRRKDSGP	---VVKKIREM	QKFLGLEVTG	KLDSDTLEVMRK	PRCGVP	
hsstrom2.pep	Y-YNLEKDVVKQF-RRKDSNL	---IVKKIQGM	QKFLGLEVTG	KLDDTDTLEVMRK	PRCGVP	
hsstrol3.pep	---LPPDVHHLHAERRGPQ	WHAALPSSPAPAP	-----ATQEAP	RASSLRPP	PRCGVP	
		+		++	+	++ + + + + *
MMPm1a.pep	DKFGAEIKANV--RRKRYAI	QGLKWQHNEITFCI	QNYTPKVGEYATY	EAIRKAFRVWESA		
MMPm1b.pep	DKFGAEIKANV--RRKRYAI	QGLKWQHNEITFCI	QNYTPKVGEYATY	EAIRKAFRVWESA		
MMPm2.pep	DQFGVRVKANLRRRRKRYAL	TGRKWNHHLTFSI	QNYTEKLGWYH	SMEAVRRAPRVWQA		
hscollr.pep	DVAQFVLTEGNP-----	RWEQTHLTYRIENY	TPDLPRADVDAI	EKAQFQWSNV		
hscigna.pep	DSGGFMLTPGNP-----	KWERTNLTYRIENY	TPQLSEAEVERAI	KDAFELWSVA		
p08253.swisspro	DVANYNFFPRKP-----	KWDKNQITYRIIGY	TPDLDPETVDDA	FAFAFQVWSDV		
hs4cola.pep	DLGRFQTFEGDL-----	KWHHHNITYYI	QNYSEDLPRAVI	DDAFARAFALWSAV		
hsmmp3a.pep	DVGHFRTFPGP	-----KWRKTHLTYRI	VNYTPDLPKDAVDS	AVEKALKVWEEV		
hsstrom2.pep	DVGHFSSFP	GM-----KWRKTHLTYRI	VNYTPDLPRDAVDS	SAIEKALKVWEEV		
hsstrol3.pep	DPSDG---LSARNRQKR	FVLSGGRWEKTDLT	TYRIILRFPWQV	QEQVRQMAEAL	KVWSDV	
	*		++ + + + + *	++ + +		+ * + + + +
MMPm1a.pep	TPLRFREVVPYAYIREGHEK	QADIMIFFAEGF	HGDSTPFDGEGG	FLAHAYFPGPNIGGDTH		
MMPm1b.pep	TPLRFREVVPYAYIREGHEK	QADIMIFFAEGF	HGDSTPFDGEGG	FLAHAYFPGPNIGGDTH		
MMPm2.pep	TPLVFQEVVPYEDIRLRRQKEAD	IMVLFASGFHGDSSP	FDGTGGFLAHAYFPG	PGIGGDTH		
hscollr.pep	TPLTFTKV-----	SEGQADIMISFVRG	DHRDNSPFDGPGN	LAHAFQPGPGIGGDAH		
hscigna.pep	SPLIFTRI-----	SQGEADINIAFYQ	RDHGDN	SPFDGPGN	ILAHAFQPGQIGGDAH	
p08253.swisspro	TPLRFSRI-----	HDGEADIMINFR	WEHGDGYPFDGK	DGLLAHAFAPGTG	VGGDSH	
hs4cola.pep	TPLTFTRV-----	YSRDADIVIQF	GVAEHGDGYPFDGK	DGLLAHAFPPGPGI	QGDH	
hsmmp3a.pep	TPLTFSRL-----	YEGEADIMISFAV	REHGDGYPFDGPGN	VLAHAYAPGPGINGDAH		
hsstrom2.pep	TPLTFSRL-----	YEGEADIMISFAV	KEHGDGYPFDGPGH	SLAHAYPPGPGLYGDIH		
hsstrol3.pep	TPLTFTEV-----	HEGRADIMIDFARY	WDGDDLPFDGPGI	LAHAFPKTHREGDVH		
	*** * +		*** + *	+ * + + + +	*** + *	*** *

Abb. 3a

ERSATZBLATT

17

```

MMPm1a.pep      FDSAEPWTVRNEDL-----
MMPm1b.pep      FDSAEPWTVRNEDL-----
MMPm2.pep       FDADEFWTFSSIDL-----
hscollr.pep     FDEHERWTNNFT-----
hscigna.pep     FDAEETWTNTSA-----
p08253.swisspro FDDDELWTLGEGQVVRVKYGNADGEYCKFPFLPNGKEYNSCTDTGRSDGFLWCSTTYNFE
hs4cola.pep     FDDDELWSLKGKGVVVPTRFGNADGAACHFPFIFEGRSYSACTTDGRSDGLPWCSTTANYD
hsmmp3a.pep     FDDDEQWTKDIT-----
hsstrom2.pep    FDDDEKWTEDAS-----
hsstrol3.pep    FDYDETWTIGDDQ-----
                ** * * +

```

```

MMPm1a.pep      -----
MMPm1b.pep      -----
MMPm2.pep       -----
hscollr.pep     -----
hscigna.pep     -----
p08253.swisspro KDGGYGFPCPHEALFTMGGAEGQCKFPFRFQGTSYDSCTTEGRDGYRWCGTTEDYDRD
hs4cola.pep     TDDRFGFCPSERLYTRDGNADGKPCQFPFIFEGRSYSACTTDGRSDGYRWCAATTANYDRD
hsmmp3a.pep     -----
hsstrom2.pep    -----
hsstrol3.pep    -----

```

```

MMPm1a.pep      -----
MMPm1b.pep      -----
MMPm2.pep       -----
hscollr.pep     -----
hscigna.pep     -----
p08253.swisspro KKYGFPCPETAMSTV-GGNSEGAPCVFPFTFLGNKYESCTSAGRS DGKMWCAATTANYDDDR
hs4cola.pep     KLFGFCPTRADSTVMGGNSAGELCVFPFTFLGKEYSTCTSEGRGDGRLWCATTSNFDS DK
hsmmp3a.pep     -----
hsstrom2.pep    -----
hsstrol3.pep    -----

```

```

MMPm1a.pep      -----NGNDIFLVAVHELGHALGLEHSSDPSAIMAPFYQ-WMDTENFVLPDDDRRGIQ
MMPm1b.pep      -----NGNDIFLVAVHELGHALGLEHSSDPSAIMAPFYQ-WMDTENFVLPDDDRRGIQ
MMPm2.pep       -----HGNNLFLVAVHELGHALGLEHSSNPNAIMAPFYQ-WKDVDNFKLPEDDLRGIQ
hscollr.pep     -----EYNLHRVAAHELGHSLGLSHSTDIGALMYPY- TF--SGDVQLAQDDIDGIQ
hscigna.pep     -----NYNLFLVAAHEFGHSLGLAHSSDPGALMYPNY- AFRETSNYSLPQDDIDGIQ
p08253.swisspro KWGFCDQGYSLFLVAAHEFGHAMGLEHSQDPGALMAPIYT-YTK--NFRLSQDDIKGIQ
hs4cola.pep     KWGFCDQGYSLFLVAAHEFGHALGLDHSSVPEALMYPMYR-FTE--GPPLHKDDVNGIR
hsmmp3a.pep     -----GTNLFLVAAHEIGHSLGLFHSANTEALMYPLYHSLTDLTFRLSQDDINGIQ
hsstrom2.pep    -----GTNLFLVAAHELGHSLGLFHSANTEALMYPLYSFTELAQFRLSQDDVNGIQ
hsstrol3.pep    -----GTDLLQVAAHEFGHVLGLQHTTAALKALMSAFYT-FRYP--LSLSPDDCRGVQ
                + ++ * + * + * + * + * + * + * + * + * + * + * +

```

Abb. 3b

ERSATZBLATT

18

```

MMPm1a.pep  QLYGGESG-----FPTKMPP--QP-RTTSRPSVPDKPKNPT-----
MMPm1b.pep  QLYGGESG-----FPTKMPP--QP-RTTSRPSVPDKPKNPT-----
MMPm2.pep    QLYGTPDG---QPQPTQPLPTVTPR--RPGRPDHRPPRPPQPPPPGGKQERPPKPGFPV
hscollr.pep  AIYGRSQN-----PVQ-----PIGPQTPK
hsc1gna.pep  AIYGLSSN-----PIQ-----PTGPSTPK
p08253.swisspro ELYGASPDIDL-----GTGPT-----PTLGPVTP
hs4cola.pep  HLYGPRPEPEPRPPTTTTPQPTAPPTVCPTGPPVHPSERPTAGTGPSSAGPTGPPTAG
hsmmp3a.pep  SLYGPPPD-----SPETPLVPTPEVPVPEPGTPA
hsstrom2.pep SLYGPPPA-----STEEPLVPTKSVPSGSEMPA
hsstrol3.pep HLYG-----QPWPTVTSR--TPALG-----PQAGIDTNEIAP-----L

```

+ **

```

MMPm1a.pep  -----YGNICDGN--FDTVAMLRGEMFVFKERWFWVRVNNQVMD-GYPMPIGQF
MMPm1b.pep  -----YGNICDGN--FDTVAMLRGEMFVFKERWFWVRVNNQVMD-GYPMPIGQF
MMPm2.pep    QPRATERPDQYGNICDGD--FDTVAMLRGEMFVFKGRWFWVRVNRVLD-NYPMPIGHF
hscollr.pep  A-----CDSKLTFDAITIRGEVMMFKDRFYMR-TNPFYPEVELNF-TSVF
hsc1gna.pep  P-----CDPSLTFDAITTLRGEILFFKDRYFWR-RHPQLQRVEMNF-ISLF
p08253.swisspro -----EICKQDIVDGIQIRGEIFFFKDRFIWRTVTPRD-KPMGPLLATF
hs4cola.pep  PSTATTVPLSPVDDACNVNI-FDAIAEIGNQLYLFKDKGYWRFSEGRGSRPQGPFLIADK
hsmmp3a.pep  N-----CDPALSFDAVSTLRGEILIFKDRHFWR-KSLRKLEPELHL-ISSF
hsstrom2.pep K-----CDPALSFDAISTLRGEYLFKDRYFWR-RSHWNPEPEFHL-ISAF
hsstrol3.pep EPDAP-----PDACEAS--FDAVSTIRGELFFFKAGFVWRLRGQLQP-GYPALASRH

```

*+ *++ + + + *++ *

```

MMPm1a.pep  WRGLPASINTAYER-KDGKFVFFKGDKHWFDEASLEPGYPKHI-KELGRGLPTDKIDAA
MMPm1b.pep  WRGLPASINTAYER-KDGKFVFFKGDKHWFDEASLEPGYPKHI-KELGRGLPTDKIDAA
MMPm2.pep    WRGLPGDISAAYER-QDGRFVFFKGDYWLFRANLEPGYPQL-TSYGLGIPYDRIDTA
hscollr.pep  WPQLPNGLEAAYEFADRDEVRFKGNKYWAVQGNVLHGYPKDIYSSFGFPRTVKHIDAA
hsc1gna.pep  WPSLPTGIQAAYEDFDRDLIFLFGKNQYWALSGYDILQGYPKDI-SNYGFPSSVQIDA
p08253.swisspro WPPEKIDAVYEAPQEEKAVFFAGNEYWIYSASTLERGYPKPL-TSLGLPPDVQRVDAA
hs4cola.pep  WPALPRKLDVSVEEPLSKKLFFFSGRQVWYTGASVL-G-PRRL-DKLGGLGADVAQVTGA
hsmmp3a.pep  WPSLPSGVDAAYEVTSKDLVFIKGNQFWAIRGNEVRAGYPRGIHT-LGFPPTVRKIDAA
hsstrom2.pep WPSLPSYLDAAAYEVNSRDTVFIKGNFQWVWIRGNEVQAGYPRGIHT-LGFPPTIRKIDAA
hsstrol3.pep WQGLPSPVDAAFED-AQGHIWFFQGAQYVWYDGEKPVLG-PAPL-TELG--LVRFPVHAA

```

*+ ** + + + + *+ * * + + *+ + + *

```

MMPm1a.pep  LFWMPN-GKTYFFRGNKYYRFNEELRAVDSEYPKNIK-VWEGIPESPRGSFPMGSDEVFTY
MMPm1b.pep  LFWMPN-GKTYFFRGNKYYRFNEELRAVDSEYPKNIK-VWEGIPESPRGSFPMGSDEVFTY
MMPm2.pep    IWWEPT-GHTFFQEDRYWRFNEETQRGDPGYPKPIS-VWQGIAPSPKGAFLSNDAAITY
hscollr.pep  LS-EENTGKTYFFVANKYWRYDEYKRSMDPGYPKMIADHDFPGIGHKVDAV--FMKDGFFY
hsc1gna.pep  VF--YRSKTYFFVNDQFWRYDNQRQFMPEPGYPKSISGAFPGIESKVDAV--FQGEHFFH
p08253.swisspro FN-WSKNKTYIFAGDKFWRYNEVKKMDPGFPKL IADAWNAI PDNLDAVVDLQGGGHSY
hs4cola.pep  LR-SGRGKM-LLFSGRRLWRFVKAQMVDPRSASEVDRMFPGPV--LDTHDVQYREKAY
hsmmp3a.pep  IS-DKEKNKTYFFVEDKYWRFDENQSMEQGFPRLIADDFPGVEPKVDAV--LQAFGFFY
hsstrom2.pep VS-DKEKKKTYFFAADKYWRFDENQSMEQGFPRLIADDFPGVEPKVDAV--LQAFGFFY
hsstrol3.pep LVWGPEKNKIYFFRGRDYWRFHPSSTRRVDSVPVRRAT-DWRGVPSIDAFAFQDADG-YAY

```

*+ + *++ + + *++ + + *

Abb. 3c

ERSATZBLATT

cDNA-Sequenz mmpmla:

1 ACCATTTTGC ATCCACAG CAGTGAATGA GAGCTCCTGT TTCTCCACAT
51 TCTCACCAGC ATTTGGTGTG GCTGGTGTTC TGGATTTTGG CCATTCTAAT
101 AGGTGTGTCA TGGTATCTCA TTGTTTTAAT TTGCATTCTCT GATGACATAT
151 GAGATGGAGC ATCTTTTCAG ATGCTTATTT GCTGCCTGTG TATCTTCTTT
201 GGTCTTTGGC TCATTTTTTA ATCACGTTGT TTCCTTTTCC TTTCTTTTTT
251 TTGAGAGTCT TGCTCTGTCA TCCGGGGTGG AGTGCAATGG TGCAATCTCA
301 GCCTACTGCA ACCTCTGTCT CCTGGGTTCA AGTGATTCTC CTGCCTCAGC
351 CTCCCAAATA GCTGGCAAAG CTGATGCAGA CACCATGAAG GCCATGAGGC
401 GCCCCCGATG TGGTGTTCCTA GACAAGTTTG GGGCTGAGAT CAAGGCCAAT
451 GTTCGAAGGA AGCGCTACGC CATCCAGGGT CTCAAATGGC AACATAATGA
501 AATCACTTTC TGCATCCAGA ATTACACCCC CAAGGTGGGC GAGTATGCCA
551 CATACGAGGC CATTCGCAAG GCGTTCCGCG TGTGGGAGAG TGCCACACCA
601 CTGCGCTTCC GCGAGGTGCC CTATGCCTAC ATCCGTGAGG GCCATGAGAA
651 GCAGGCCGAC ATCATGATCT TCTTTGCCGA GGGCTTCCAT GGCGACAGCA
701 CGCCCTTCGA TGGTGAGGGC GGCTTCCTGG CCCATGCCTA CTTCCCAGGC
751 CCCAACATTG GAGGAGACAC CCACTTTGAC TCTGCCGAGC CTTGGACTGT
801 CAGGAATGAG GATCTGAATG GAAATGACAT CTTCTGGTG GCTGTGCACG
851 AGCTGGGCCA TGCCCTGGGG CTCGAGCATT CCAGTGACCC CTCGGCCATC
901 ATGGCACCCCT TTTACCAGTG GATGGACACG GAGAATTTTG TGCTGCCCCGA
951 TGATGACCGC CGGGGCATCC AGCAACTTTA TGGGGGTGAG TCAGGGTTCC
1001 CCACCAAGAT GCCCCCTCAA CCCAGGACTA CCTCCCGGCC TTCTGTTCCT
1051 GATAAACCCA AAAACCCAC CTATGGGCCC AACATCTGTG ACGGGAACCT

ERSATZBLATT

27

1101 TGACACCGTG GCCATGCTCC GAGGGGAGAT GTTTGTCTTC AAGGAGCGCT
1151 GGTTCCTGGCG GGTGAGGAAT AACCAAGTGA TGGATGGATA CCCAATGCCC
1201 ATTGGCCAGT TCTGGCGGGG CCTGCCTGCG TCCATCAACA CTGCCTACGA
1251 GAGGAAGGAT GGCAAATTCG TCTTCTTCAA AGGAGACAAG CATTGGGTGT
1301 TTGATGAGGC GTCCCTGGAA CCTGGCTACC CCAAGCACAT TAAGGAGCTG
1351 GGCCGAGGGC TGCCTACCGA CAAGATTGAT GCTGCTCTCT TCTGGATGCC
1401 CAATGGAAAG ACCTACTTCT TCCGTGGAAA CAAGTACTAC CGTTTCAACG
1451 AAGAGCTCAG GGCAGTGGAT AGCGAGTACC CCAAGAACAT CAAAGTCTGG
1501 GAAGGGATCC CTGAGTCTCC CAGAGGGTCA TTCATGGGCA GCGATGAAAGT
1551 CTTCACTTAC TTCTACAAGG GGAACAAATA CTGGAAATTC AACAACCAGA
1601 AGCTGAAGGT AGAACCAGGC TACCCCAAGT CAGCCCTGAG GGAAGTGGATG
1651 GGCTGCCCCAT CGGGAGGCCG GCCGGATGAG GGGACTGAGG AGGAGACGGA
1701 GGTGATCATC ATTGAGGTGG ACGAGGAGGG CGGCGGGGCG GTGAGCGCGG
1751 CTGCCGTGGT GCTGCCCCGTG CTGCTGCTGC TCCTGGTGCT GGCGGTGGGC
1801 CTTGCAGTCT TCTTCTTCAG ACGCCATGGG ACCCCCAGGC GACTGCTCTA
1851 CTGCCAGCGT TCCCTGCTGG ACAAGGTCTG ACGCCCACCG CCGGCCCGCC
1901 CACTCCTACC ACAAGGACTT TGCCTCTGAA GGCCAGTGGC AGCAGGTGGT
1951 GGTGGGTGGG CTGCTCCCAT CGTCCCGAGC CCCCTCCCCG CAGCCTCCTT
2001 GCTTCTCTCT GTCCCCTGGC TGGCCTCCTT CACCCTGACC GCCTCCCTCC
2051 CTCCTGCCCC GGCATTGCAT CTTCCCTAGA TAGGTCCCCT GAGGGCTGAG
2101 TGGGAGGGCG GCCCTTTCCA GCCTCTGCCC CTCAGGGGAA CCCTGTAGCT
2151 TTGTGTCTGT CCAGCCCCAT CTGAATGTGT TGGGGGCTCT GCACTTGAAG
2201 GCAGGACCCT CAGACCTCGC TGGTAAAGGT CAAATGGGGT CATCTGCTCC
2251 TTTTCCATCC CCTGACATAC CTTAACCTCT GAACTCTGAC CTCAGGAGGC

ERSATZBLATT

22

2301 TCTGGGCACT CCAGCCCTGA AAGCCCCAGG TGTACCCAAT TGGCAGCCTC
2351 TCACTACTCT TTCTGGCTAA AAGGAATCTA ATCTTGTTGA GGGTAGAGAC
2401 CCTGAGACAG TGTGAGGGGG TGGGGACTGC CAAGCCACCC TAAGACCTTG
2451 GGAGGAAAAC TCAGAGAGGG TCTTCGTTGC TCAGTCAGTC AAGTTCCTCG
2501 GAGATCTGCC TCTGCCTCAC CTACCCCAGG GAACTTCCAA GGAAGGAGCC
2551 TGAGCCACTG GGGACTAAGT GGGCAGAAGA AACCCTTGGC AGCCCTGTGC
2601 CTCTCGAATG TTAGCCTTGG ATGGGGCTTT CACAGTTAGA AGAGCTGAAA
2651 CCAGGGGTGC AGCTGTCAGG TAGGGTGGGG CCGGTGGGAG AGGCCCGGGT
2701 CAGAGCCCTG GGGGTGAGCC TGAAGGCCAC AGAGAAAGAA CCTTGCCCAA
2751 ACTCAGGCAG CTGGGGCTGA GGCCCAAAGG CAGAACAGCC AGAGGGGGCA
2801 GGAGGGGACC AAAAAGGAAA ATGAGGACGT GCAGCAGCAT TGGAAGGCTG
2851 GGGCCGGGCA GGCCAGGCCA AGCCAAGCAG GGGGCCACAG GGTGGGCTGT
2901 GGAGCTCTCA GGAAGGGCCC TGAGGAAGGC ACACTTGCTC CTGTTGGTCC
2951 CTGTCCCTGC TGCCCAGGCA GCGTGGAGGG GAAGGGTAGG GCAGCCAGAG
3001 AAAGGAGCAG AGAAGGCACA CAAACGAGGA ATGAGGGGCT TCACGAGAGG
3051 CCACAGGGCC TGGCTGGCCA CGCTGTCCCG GCCTGCTCAC CATCTCAGTG
3101 AGGGGCAGGA GCTGGGGCTC GCTTAGGCTG GGTCCACGCT TCCCTGGTGC
3151 CAGCACCCCT CAAGCCTGTC TCACCAGTGG CCTGCCCTCT CGCTCCCCCA
3201 CCCAGCCCAC CCATTGAAGT CTCCTTGGGC CACCAAAGGT GGTGGCCATG
3251 GTACCGGGGA CTTGGGAGAG TGAGACCCAG TGGAGGGAGC AAGAGGAGAG
3301 GGATGTCGGG GGGGTGGGGC ACGGGGTAGG GGAAATGGGG TGAACGGTGC
3351 TGGCAGTTCG GCTAGATTTC TGTCTTGTTT GTTTTTTGT TTTGTTTAAT
3401 GTATATTTTT ATTATAATTA TTATATATGA ATTCCAAAAA AAAAAAAAAA
3451 AAAAAA

ERSATZBLATT

cDNA-Sequenz mmp1b:

1 AAGTTCAGTG CCTACCGAAG ACAAAGGCGC CCCGAGGGAG TGGCGGTGCG
51 ACCCCAGGGC GTGGGCCCCG CCGCGGAGCC CACACTGCCC GGCTGACCCG
101 GTGGTCTCGG ACCATGTCTC CCGCCCCAAG ACCCCCCCGT TGTCTCCTGC
151 TCCCCCTGCT CACGCTCGGC ACCGCGCTCG CCTCCCTCGG CTCGGCCCCA
201 AGCAGCAGCT TCAGCCCCGA AGCCTGGCTA CAGCAATATG GCTACCTGCC
251 TCCCGGGGAC CTACGTACCC ACACACAGCG CTCACCCAG TCACTCTCAG
301 CGGCCATCGC TGCCATGCAG AAGTTTTACG GCTTGCAAGT AACAGGCAAA
351 GCTGATGCAG ACACCATGAA GGCCATGAGG CGCCCCGAT GTGGTGTTC
401 AGACAAGTTT GGGGCTGAGA TCAAGGCCAA TGTTCGAAGG AAGCGCTACG
451 CCATCCAGGG TCTCAAATGG CAACATAATG AAATCACTTT CTGCATCCAG
501 AATTACACCC CCAAGGTGGG CGAGTATGCC ACATACGAGG CCATTGCGAA
551 GCGGTTCCGC GTGTGGGAGA GTGCCACACC ACTGCGCTTC CGCGAGGTGC
601 CCTATGCCTA CATCCGTGAG GGCCATGAGA AGCAGGCCGA CATCATGATC
651 TTCTTTGCCG AGGGCTTCCA TGGCGACAGC ACGCCCTTCG ATGGTGAGGG
701 CGGCTTCCTG GCCCATGCCT ACTTCCCAGG CCCCAACATT GGAGGAGACA
751 CCCACTTTGA CTCTGCCGAG CCTTGGA CTG TCAGGAATGA GGATCTGAAT
801 GGAAATGACA TCTTCCTGGT GGCTGTGCAC GAGCTGGGCC ATGCCCTGGG
851 GCTCGAGCAT TCCAGTGACC CCTCGGCCAT CATGGCACCC TTTTACCAGT
901 GGATGGACAC GGAGAATTTT GTGCTGCCCC ATGATGACCG CCGGGGCATC
951 CAGCAACTTT ATGGGGGTGA GTCAGGGTTC CCCACCAAGA TGCCCCCTCA
1001 ACCCAGGACT ACCTCCCGGC CTTCTGTTCC TGATAAACCC AAAAACCCCA
1051 CCTATGGGCC CAACATCTGT GACGGGAACT TTGACACCGT GGCCATGCTC

ERSATZBLATT

24

1101 CGAGGGGAGA TGT TTGTCTT CAAGGAGCGC TGGTTCTGGC GGGTGAGGAA
1151 TAACCAAGTG ATGGATGGAT ACCCAATGCC CATTGGCCAG TTCTGGCGGG
1201 GCCTGCCTGC GTCCATCAAC ACTGCCTACG AGAGGAAGGA TGGCAAATTC
1251 GTCTTCTTCA AAGGAGACAA GCATTGGGTG TTGATGAGG CGTCCCTGGA
1301 ACCTGGCTAC CCCAAGCACA TTAAGGAGCT GGGCCGAGGG CTGCCTACCG
1351 ACAAGATTGA TGCTGCTCTC TTCTGGATGC CCAATGGAAA GACCTACTTC
1401 TTCCGTGGAA ACAAGTACTA CCGTTTCAAC GAAGAGCTCA GGGCAGTGGA
1451 TAGCGAGTAC CCCAAGAACA TCAAAGTCTG GGAAGGGATC CCTGAGTCTC
1501 CCAGAGGGTC ATTCATGGGC AGCGATGAAG TCTTCACTTA CTTCTACAAG
1551 GGGAAACAAAT ACTGGAAATT CAACAACCAG AAGCTGAAGG TAGAACCGGG
1601 CTACCCCAAG TCAGCCCTGA GGGACTGGAT GGGCTGCCCA TCGGGAGGCC
1651 GGCCGGATGA GGGGACTGAG GAGGAGACGG AGGTGATCAT CATTGAGGTG
1701 GACGAGGAGG GCGGCGGGGC GGTGAGCGCG GCTGCCGTGG TGCTGCCCGT
1751 GCTGCTGCTG CTCTGGTGC TGGCGGTGGG CTTGCAGTC TTCTTCTTCA
1801 GACGCCATGG GACCCCCAGG CGACTGCTCT ACTGCCAGCG TTCCCTGCTG
1851 GACAAGGTCT GACGCCCACC GCCGGCCCGC CCACTCCTAC CACAAGGACT
1901 TTGCCTCTGA AGGCCAGTGG CAGCAGGTGG TGGTGGGTGG GCTGCTCCCA
1951 TCGTCCCGAG CCCCCTCCCC GCAGCCTCCT TGCTTCTCTC TGTCCCCTGG
2001 CTGGCCTCCT TCACCCTGAC CGCCTCCCTC CCTCCTGCCC CGGCATTGCA
2051 TCTTCCCTAG ATAGGTCCCC TGAGGGCTGA GTGGGAGGGC GGCCCTTTCC
2101 AGCCTCTGCC CCTCAGGGGA ACCCTGTAGC TTTGTGTCTG TCCAGCCCCA
2151 TCTGAATGTG TTGGGGGCTC TGCATTGAA GGCAGGACCC TCAGACCTCG
2201 CTGGTAAAGG TCAAATGGGG TCATCTGCTC CTTTCCATC CCCTGACATA
2251 CCTTAACCTC TGA ACTCTGA CCTCAGGAGG CTCTGGGCAC TCCAGCCCTG

ERSATZBLATT

25

2301 AAAGCCCCAG GTGTACCCAA TTGGCAGCCT CTCACTACTC TTTCTGGCTA
2351 AAAGGAATCT AATCTTGTTG AGGGTAGAGA CCCTGAGACA GTGTGAGGGG
2401 GTGGGGACTG CCAAGCCACC CTAAGACCTT GGGAGGAAAA CTCAGAGAGG
2451 GTCTTCGTTG CTCAGTCAGT CAAGTTCCTC GGAGATCTGC CTCTGCCTCA
2501 CCTACCCCAG GGAACCTTCCA AGGAAGGAGC CTGAGCCACT GGGGACTAAG
2551 TGGGCAGAAG AAACCCTTGG CAGCCCTGTG CCTCTCGAAT GTTAGCCTTG
2601 GATGGGGCTT TCACAGTTAG AAGAGCTGAA ACCAGGGGTG CAGCTGTCAG
2651 GTAGGGTGGG GCCGGTGGGA GAGGCCCGGG TCAGAGCCCT GGGGGTGAGC
2701 CTGAAGGCCA CAGAGAAAGA ACCTTGCCCA AACTCAGGCA GCTGGGGCTG
2751 AGGCCCCAAG GCAGAACAGC CAGAGGGGGC AGGAGGGGAC CAAAAGGAA
2801 AATGAGGACG TGCAGCAGCA TTGGAAGGCT GGGGCCGGGC AGGCCAGGCC
2851 AAGCCAAGCA GGGGGCCACA GGGTGGGCTG TGGAGCTCTC AGGAAGGGCC
2901 CTGAGGAAGG CACACTTGCT CCTGTTGGTC CCTGTCCTTG CTGCCCAGGC
2951 AGCGTGGAGG GGAAGGGTAG GGCAGCCAGA GAAAGGAGCA GAGAAGGCAC
3001 ACAAACGAGG AATGAGGGGC TTCACGAGAG GCCACAGGGC CTGGCTGGCC
3051 ACGCTGTCCC GGCCTGCTCA CCATCTCAGT GAGGGGCAGG AGCTGGGGCT
3101 CGCTTAGGCT GGGTCCACGC TTCCCTGGTG CCAGCACCCC TCAAGCCTGT
3151 CTCACCAAGT GCCTGCCCTC TCGCTCCCCC ACCCAGCCCA CCCATTGAAG
3201 TCTCCTTGGG CCACCAAAGG TGGTGGCCAT GGTACCGGGG ACTTGGGAGA
3251 GTGAGACCCA GTGGAGGGAG CAAGAGGAGA GGGATGTCGG GGGGGTGGGG
3301 CACGGGGTAG GGGAAATGGG GTGAACGGTG CTGGCAGTTC GGCTAGATTT
3351 CTGTCTTGTT TGTTTTTTTG TTTTGTTTAA TGTATATTTT TATTATAATT
3401 ATTATATATG AATTCCAAAA AAAAAAAAAA AAAAAA

ERSATZBLATT

cDNA-Sequenz mmpm2:

1 GCGAGGATCC GGC GTG CAGT GTTCCGAGCT GGGCTGGGCG CCGAGAGCAT
51 GGGCAGCGAC CCGAGCGCGC CCGGACGGCC GGGCTGGACG GGCAGCCTCC
101 TCGGCGACCG GGAGGAGGCG GCGCGGCCGC GACTGCTGCC GCTGCTCCTG
151 GTGCTTCTGG GCTGCCTGGG CCTTGGCGTA GCGGCCGAAG ACGCGGAGGT
201 CCATGCCGAG AACTGGCTGC GGCTTTATGG CTACCTGCCT CAGCCCAGCC
251 GCCATATGTC CACCATGCGT TCCGCCCAGA TCTTGGCCTC GGCCCTTGCA
301 GAGATGCAGC GCTTCTACGG GATCCCAGTC ACCGGTGTGC TCGACGAAGA
351 GACCAAGGAG TGGATGAAGC GGCCCCGCTG TGGGGTGCCA GACCAGTTCG
401 GGGTACGAGT GAAAGCCAAC CTGCGGCGGC GTCGGAAGCG CTACGCCCTC
451 ACCGGGAGGA AGTGGAACAA CCACCATCTG ACCTTTAGCA TCCAGAACTA
501 CACGGAGAAG TTGGGCTGGT ACCACTCGAT GGAGGCGGTG CGCAGGGCCT
551 TCCGCGTGTG GGAGCAGGCC ACGCCCCTGG TCTTCCAGGA GGTGCCCTAT
601 GAGGACATCC GGCTGCGGCG ACAGAAGGAG GCCGACATCA TGGTACTCTT
651 TGCCTCTGGC TTCCACGGCG ACAGCTCGCC GTTTGATGGC ACCGGTGGCT
701 TTCTGGCCCA CGCCTATTTC CCTGGCCCCG GCCTAGGCGG GGACACCCAT
751 TTTGACGCAG ATGAGCCCTG GACCTTCTCC AGCACTGACC TGCATGGAAA
801 CAACCTCTTC CTGGTGGCAG TGCATGAGCT GGGCCACGCG CTGGGGCTGG
851 AGCACTCCAG CAACCCCAAT GCCATCATGG CGCCGTTCTA CCAGTGAAG
901 GACGTTGACA ACTTCAAGCT GCCCGAGGAC GATCTCCGTG GCATCCAGCA
951 GCTCTACGGT ACCCCAGACG GTCAGCCACA GCCTACCCAG CCTCTCCCCA
1001 CTGTGACGCC ACGGCGGCCA GGCCGGCCTG ACCACCGGCC GCCCCGGCCT
1051 CCCCAGCCAC CACCCCCAGG TGGGAAGCCA GAGCGGCCCC CAAAGCCGGG
1101 CCCCCAGTC CAGCCCCGAG CCACAGAGCG GCCCGACCAG TATGGCCCCA

ERSATZBLATT

27

1151 ACATCTGCGA CGGGGACTTT GACACAGTGG CCATGCTTCG CGGGGAGATG
1201 TTCGTGTTCA AGGGCCGCTG GTTCTGGCGA GTCCGGCACA ACCGCGTCCT
1251 GGACAACTAT CCCATGCCCA TCGGGCACTT CTGGCGTGGT CTGCCCCGGTG
1301 ACATCAGTGC TGCCTACGAG CGCCAAGACG GTCGTTTGT CTTTTTCAAA
1351 GGTGACCGCT ACTGGCTCTT TCGAGAAGCG AACCTGGAGC CCGGCTACCC
1401 ACAGCCGCTG ACCAGCTATG GCCTGGGCAT CCCCTATGAC CGCATTGACA
1451 CGGCCATCTG GTGGGAGCCC ACAGGCCACA CCTTCTTCTT CCAAGAGGAC
1501 AGGTACTGGC GCTTCAACGA GGAGACACAG CGTGGAGACC CTGGGTACCC
1551 CAAGCCCATC AGTGTCTGGC AGGGGATCCC TGCCTCCCCT AAAGGGGCCCT
1601 TCCTGAGCAA TGACGCAGCC TACACCTACT TCTACAAGGG CACCAAATAC
1651 TGGAAATTCG ACAATGAGCG CCTGCGGATG GAGCCCGGCT ACCCCAAGTC
1701 CATCCTGCGG GACTTCATGG GCTGCCAGGA GCACGTGGAG CCAGGCCCCC
1751 GATGGCCCCG CGTGGCCCCG CCGCCCTTCA ACCCCCACGG GGGTGACAG
1801 CCGGGGGCGG ACAGCGCAGA GGGCGACGTG GGGGATGGGG ATGGGGACTT
1851 TGGGGCCGGG GTCAACAAGG ACGGGGGCAG CCGCGTGGTG GTGCAGATGG
1901 AGGAGGTGGC ACGGACGGTG AACGTGGTGA TGGTGCTGGT GCCACTGCTG
1951 CTGCTGCTCT GCGTCCTGGG CCTCACCTAC GCGCTGGTGC AGATGCAGCG
2001 CAAGGGTGCG CCACGTGTCC TGCTTTACTG CAAGCGCTCG CTGCAGGAGT
2051 GGGTCTGACC ACCCAGCGCT CCTGCTAACG GTGCTCAGGG GGCGCCTGTG
2101 GTTCTGAGAT GGCTCCCAGG GGCTCCCTCC GCCCCAGGT AGGGGGCCCT
2151 CTCAGCCCTC ACACACCCTG TCTGCCCCGC CCTCATTATT TATGTCCAGG
2201 TGTTTGTTTT GTTTTGTTTT TGGCACCTTA CTTGACCAAT TGTTTCTGTT
2251 TCCCCGACTG GGGCAGGGTG TTTAGAATTT TCTAAATGTA GTTCTGCTCC
2301 AGACAGGGAA TTAGGCCCCC ATCATCCTCT GGCTTGGCCA CAGCCAGGGG

ERSATZBLATT

28

2351 AGCAGAGGGG CAGAGGCCCA CATTGGAAGA GCAGCACCTC CTCAGCCTGA
2401 ACCCCAGGGC TGTAAGTGCC AGGCTCTCTT TGCCCAGTTG GAGACTGTCT
2451 GGCCCCCTG GTCCCCCTCT TCCCAAGTGA GTCTCTCTGG GCCTTAGGAA
2501 GAGCCTTCCA CCCAGGGGCA GCCCCAGGCC AAAGGGGACC TGAAGGGAG
2551 GTGGGCCGTG GCCCTTGAGT CCCCATGAG GCTTGGTTCC TTCCCAATCC
2601 AGTGGACTTC GCAGTCCACT TCTGACAGCC TCAGTGACCC TGGCTCCTTG
2651 TGCCAGAGAA CCCAGCCAC CCCCAGCAGC AGCCCCCAGC TCCACCTCC
2701 CCTTGGGCCC ACACCTTCTT CCCTCTCTGG AGAAAGGGCC CTGGGCCTGC
2751 CTCACCACGG ACCAAAGGGA GTCTGCCAGG GCCCCTCTCC CCAGGGAAGC
2801 AGCAGCCTCG CCCCTGGCAG AGATGCCTCC CTGAGCTAGA ACCCTCTGTT
2851 CCTTCCCTGT GCCTCCTCCC TCCCTCCCGA CTCACACCAC TAGCCTCAGG
2901 GGTCTGAGCT CCAGCTCCTT TGGGCTTCAG CTGCCAGTGT CCTGAGCCCC
2951 AGGGAGAGGG GGCTGGTGGG TGCCTAGGCC TGGGCAGTGG ATGGCCGTGA
3001 ATGGGTGCCC ACAGTGTGAG GCACTGGGCA TGAGGGGTTC CTCCCCTCCA
3051 GCTCCCTGTG CCCCCAGGGT CCTGGGAGGA GAGACACTGG TGGGGATAGG
3101 CCAGCCGCGC ATCAGACTGT GAACCCACG AAGGAGCCCA TTGTGGCCTA
3151 AGAGGCTGCC CTCCTGTGCT CAGCCCTGAG GACAGATGCC TCCTTCCTCT
3201 TTTCCTTCCC AAAGCAAGCA AGAGGCCGTG GCTGCTGTGG GAAATGGTAC
3251 TGTACAGCTG GCTCTACTTC CCCATGGCCC TGAGCGAGTG GAGTCTGCCA
3301 CCCAGGATCC CCAAGGCACT TGAGGGGGAA GGATTCTGCT GGCCTCTGCG
3351 AGTGGTTTCT TGTGCACTGG CACCAAGTGC GGGTCCGGCA GCTTCTGCCC
3401 CCTGCAGAAC CGGAGAGCCA GCTAAGGGGT GGGGCTGCGG GGGTTCCGTG
3451 TCCACCCCCA TACATTTATT TCTGTAAATA ATGTGCACTG AATAAATTGT
3501 ACAGCCGGCA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA

ERSATZBLATT

PATENTANSPRÜCHE

1. DNA- und Aminosäuresequenzen für Matrix-Metalloproteasen.
2. cDNA-Sequenzen mmpm1a, mmpm1b und mmpm2, die für menschliche Matrix-Metalloproteasen MMPm1a, MMPm1b und MMPm2 kodieren, sowie mmpm1a-, mmpm1b-, und mmpm2-enhaltende Gene des Menschen und homologe Gene anderer Säugerspezies.
3. cDNA-Sequenz mmpm1a bestehend aus
 - 5'-nichttranslatierter Region: Basenpaare 1 bis 141
 - kodierender Region: Basenpaare 142 bis 1881
 - 3'-nichttranslatierter Region: Basenpaare 1882 bis 3456(siehe Anlage 1).
4. cDNA-Sequenz mmpm1b bestehend aus
 - 5'-nichttranslatierter Region: Basenpaare 1 bis 113
 - kodierender Region: Basenpaare 114 bis 1862
 - 3'-nichttranslatierter Region: Basenpaare 1863 bis 3437(siehe Anlage 2).
5. cDNA-Sequenz mmpm2 bestehend aus
 - 5'-nichttranslatierter Region: Basenpaare 1 bis 48
 - kodierender Region: Basenpaare 49 bis 2058
 - 3'-nichttranslatierter Region: Basenpaare 2059 bis 3530(siehe Anlage 3).
6. Varianten der Sequenzen mmpm1a, mmpm1b und mmpm2, sowie homologe DNA-Sequenzen des Menschen und anderer Säugerspezies, die durch Kreuzhybridisierung mit den in den Ansprüchen 1 - 5 aufgeführten Sequenzen erhalten werden.
7. Konstrukte, die aus einem Vektor für den Gentransfer in prokaryotische oder eukaryotische Zellen und einer der Nukleotidsequenzen gemäß den Ansprüchen 1 - 6 bestehen.

8. Die Matrix-Metalloprotease MMPm1a folgender Primärstruktur:

```
1  MTYEMEHLFR CLFAACVSSL VFGSFFNHVV SFSFLFFESL ALSSGVEECNG
51 AISAYCNLCL LGSSDSPASA SQIAGKADAD TMKAMRRPRC GVPDKFGAEI
101 KANVRRKRYA IQGLKWQHNE ITFCIQNYTP KVGEYATYEA IRKAFRVWES
151 ATPLRFREVP YAYIREGHEK QADIMIFFAE GFHGDSTPPD GEGGFLAHAY
201 FPGPNIGGDT HFDSAEPWTV RNEDLNGNDI FLVAVHELGH ALGLEHSSDP
251 SAIMAPFYQW MDTENFVLPD DRRGIQQLY GGESGFPTKM PPQPRTTSRP
301 SVPDKPKNPT YGPNICDGNF DTVAMLRGEM FVFKERWFWR VRNNQVMDGY
351 PMPIGQFWRG LPASINTAYE RKDGKFVFFK GDKHWVFDEA SLEPGYPKHI
401 KELGRGLPTD KIDAALFWMP NGKTYFFRGN KYYRFNEELR AVDSEYPKNI
451 KWEGIPESP RGSFMGSDEV FTYFYKGNKY WKFNNOQLKV EPGYPKSALR
501 DWMGCPSSGR PDEGTEETE VIIIEVDEEG GGAVSAAAVV LPVLLLLLVL
551 AVGLAVFFFR RHGTPRRLLY CQRSLLDKV*
```

9. Die Matrix-Metalloprotease MMPm1b folgender Primärstruktur:

```
1  MSPAPRPPRC LLLPLLTGTLT ALASLGSAQS SSFSPEAWLQ QYGYLPPGDL
51 RTHTQRSPQS LSAAIAAMQK FYGLQVTGKA DADTMKAMRR PRCGVPDKFG
101 AEIKANVRRK RYAIQGLKWQ HNEITFCIQN YTPKVGEYAT YEAIRKAFRV
151 WESATPLRFR EVPYAYIREG HEKQADIMIF FAEGFHGDST PFDGEGGFLA
201 HAYFPGPNIG GDTHFDSAEP WTVRNEDLNG NDIFLVAVHE LGHALGLEHS
251 SDPSAIMAPF YQWMDTENFV LPDDDRRGIQ QLYGGESGFP TKMPPQPRTT
301 SRPSVPDKPK NPTYGPNICD GNFDTVAMLR GEMFVFKERW FWRVRNNQVM
351 DGYPMPIGQF WRGLPASINT AYERKDGKFV FFKGDKHWVF DEASLEPGYP
401 KHIKELGRGL PTDKIDAALF WMPNGKTYFF RGNKYYRFNE ELRAVDSEYP
```

ERSATZBLATT

451 KNIKVEGIP ESPRGSMGS DEVFTYFYKG NKYWKFNQK LKVEPGYPKS
 501 ALRDWMGCPS GGRPDEGTEE ETEVIIIEVD EBGGAVSAA AVVLPVLLLL
 551 LVLAVGLAVF FFRRHGTPRR LLYCQRSLLD KV*

10. Die Matrix-Metalloprotease MMPm2 folgender Primärstruktur:

1 MGSDPSAPGR PGWTGSLLGD REEAARPRLL PLLLVLLGCL GLGVAAEDAE
 51 VHAENWLRLY GYLPQPSRHM STMRSQAILA SALAEMQRFY GIPVTGVLDE
 101 ETKEWMKRPR CGVPDQFGVR VKANLRRRRK RYALTGRKWN NHHLTFSIQN
 151 YTEKLGWYHS MEAVRRAFRV WEQATPLVFQ EVPYEDIRLR RQKEADIMVL
 201 FASGFHGDSS PFDGTGGFLA HAYFPGPGLG GDTHFDADEP WTFSSDHLHG
 251 NNLFLVAVHE LGHALGLEHS SNPNAIMAPF YQWKDVDNFK LPEDDLRGIO
 301 QLYGTPDGQP QPTQPLPTVT PRRPGRPDHR PPRPPQPPP GGKPERPPKP
 351 GPPVQPRATE RPDQYGNIC DGDFDTVAML RGEMFVFKGR WFWVRVHRNV
 401 LDNYPMPIGH FWRGLPGDIS AAYERQDGRF VFFKGDYWL FREANLEPGY
 451 PQPLTSYGLG IPYDRIDTAI WWEPTGHTFF FQEDRYWRFN EETQRGDPGY
 501 PKPISVWQGI PASPKGAFLS NDAAITYFYK GTKYWKFDNE RLRMEPGYPK
 551 SILRDFMGCQ EHVEPGPRWP DVARPPFNPH GGAEPGADSA EGDVGDGDGD
 601 FGAGVNKDGG SRVVVQMEEV ARTVNVVMVL VLLLLLCLV GLTYALVQMQ
 651 RKGAPRVLLY CKRSLQEWV*

11. Varianten der Proteine MMPm1a, MMPm1b und MMPm2 gemäß den Ansprüchen 8 - 10, die durch posttranslationale Proteinmodifizierung, durch proteinchemische Modifikationen oder durch in vitro Mutagenese und Expression von Nukleotidfolgen nach Ansprüchen 1 - 6 erhalten werden, sowie homologe Proteine des Menschen und anderer Säugerspezies, die immunologische Kreuzaktivität oder vergleichbare Enzymaktivität aufweisen.

12. Komplexe der in den Ansprüchen 8 - 11 genannten Proteine mit einem oder mehreren Liganden.
13. Rekombinante prokaryotische und eukaryotische Zellen, die durch Transfer von DNA-Sequenzen gemäß Ansprüchen 1 - 6 in Zellen erhalten werden und die Proteine gemäß den Ansprüchen 8 - 11 exprimieren.
14. Verfahren der Gewinnung der Proteine MMPm1a, MMPm1b MMPm2 und von Varianten dieser Proteine aus natürlichen Quellen und aus rekombinanten Zellen gemäß Anspruch 13 bzw. aus Kulturüberständen rekombinanter Zellen gemäß Anspruch 13.
15. Verwendung von Matrix-Metalloproteasen MMPm1a, MMPm1b MMPm2 gemäß Ansprüchen 8 - 11 und von Zellen, die diese Enzyme exprimieren, zur Generierung proteolytischer Aktivität.
16. Verwendung von Matrix-Metalloproteasen MMPm1a, MMPm1b MMPm2 gemäß Ansprüchen 8 - 11 und von Zellen, die MMPm1a, MMPm1b MMPm2 exprimieren, zum Screening von Protease-Effektoren.

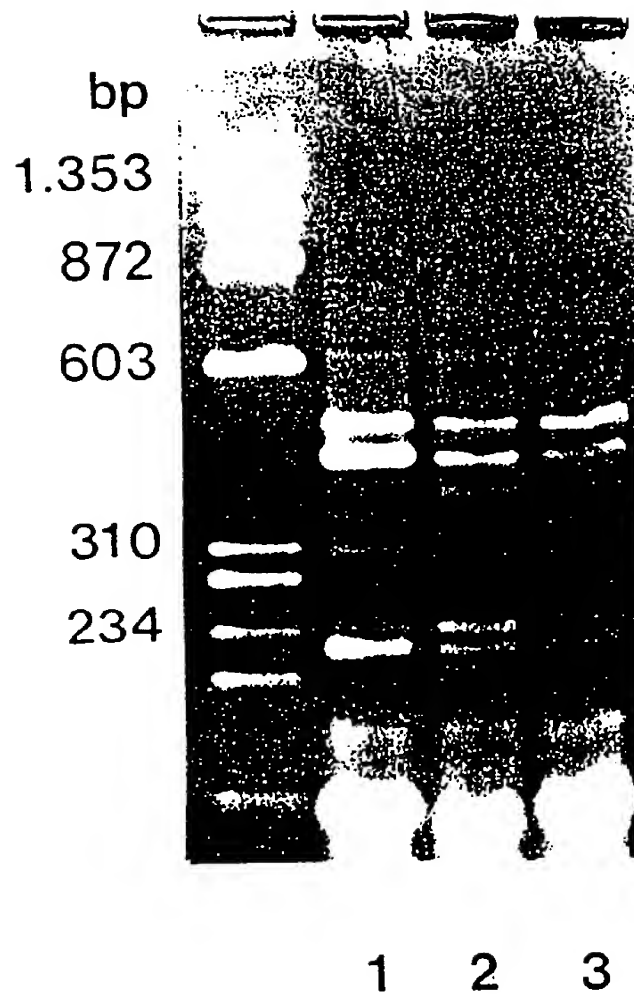


Abb. 1

ERSATZBLATT

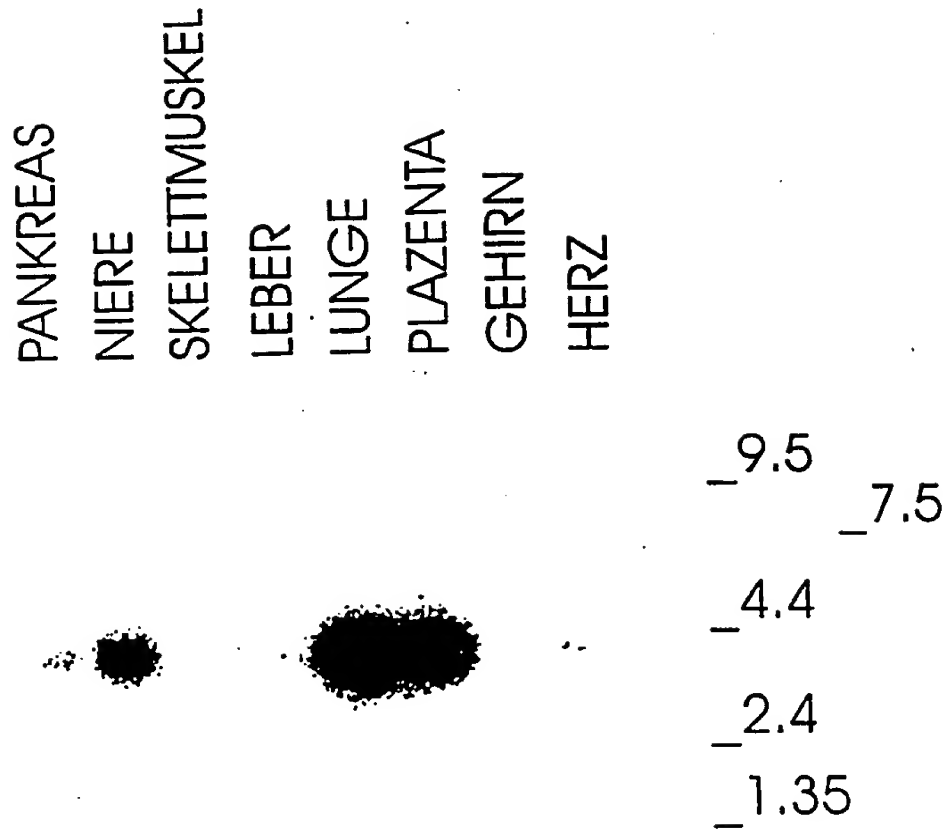


Abb. 2 (oben)

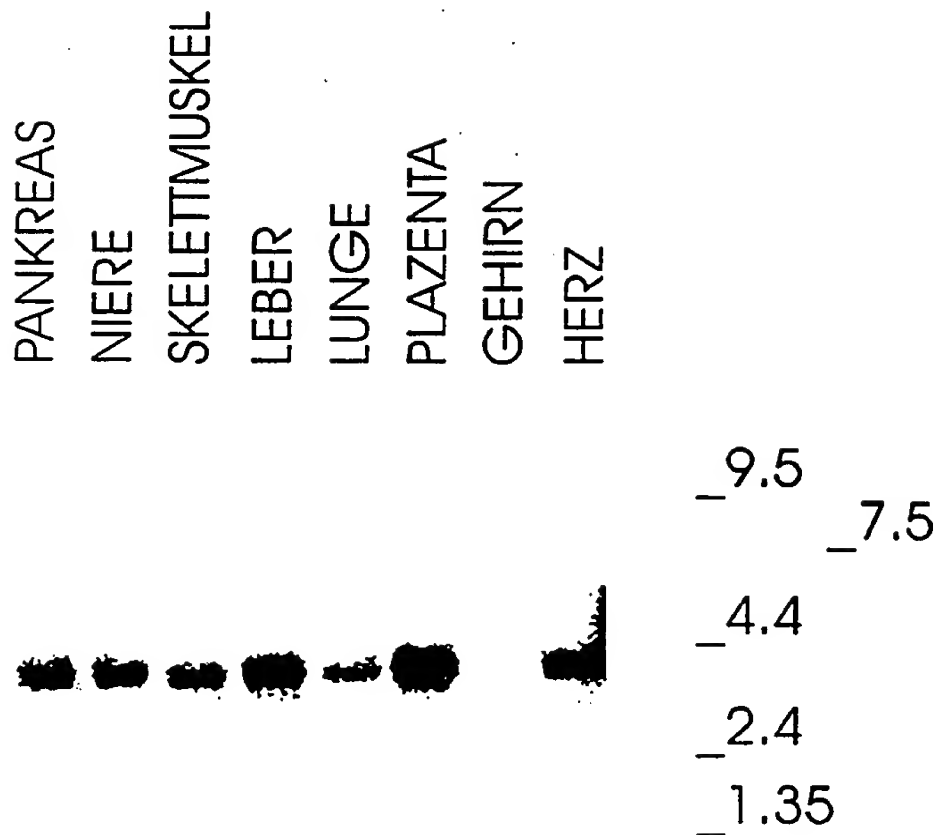


Abb. 2 (unten)